

LAMPIRAN-LAMPIRAN



Lampiran 01 . Medium untuk uji aktivitas inulinase, uji morfologi dan fisiologi isolat khamir DUCC Y4-W.

A. Medium untuk uji aktivitas inulinase

❖ Medium produksi Inulinase

| | |
|--------------------------------------|-------|
| MgSO ₄ .7H ₂ O | 0,5 g |
| KCL | 0,5 g |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 0,1 g |
| NaNO ₃ / KNO ₃ | 1,5 g |
| Inulin | 10 g |
| “Yeast Extract” | 2,5 g |
| Akuades Steril | 1 L |

Semua bahan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer. Dicampur secara merata dengan “magnetic stirrer”. Diatur pH nya pada 4,5., kemudian disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121⁰C dan tekanan 2 atm.

❖ Buffer asetat

| | |
|-------------------|-------|
| Asam asetat glas. | 6 ml |
| Natrium asetat | 8,2 g |
| Akuades steril | 3 L |

6 ml asam asetat glas. dicampur dengan 1 L akuades (campuran X). 8,2 g

Natrium asetat dicampur dengan 1 L akuades (campuran Y). 28 ml

campuran X dan 22 ml campuran Y dimasukkan ke dalam 1 L akuades.

❖ Medium Lowry

| | |
|---|--------------------------------|
| Na ₂ CO ₃ anhidrant | 10 g dalam 100 ml NaOH 100 (1) |
| CuSO ₄ .5H ₂ O | 1 g dalam 100 ml akuades (2). |

Folin 2 N 5 ml

B. Medium untuk uji morfologi dan uji fisiologi

◆ Medium Fermentasi

| | |
|-------------------|-------|
| Larutan gula 20 % | 50 ml |
|-------------------|-------|

“Yeast Extract” dilarutkan dalam akuades steril, kemudian disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm. Larutan gula 20 % disterilkan dengan proses Tyndalysasi. 450 ml larutan “Yeast Extract” ditambah dengan 50 ml larutan gula 20 %. Campuran ditempatkan pada tabung reaksi yang dilengkapi dengan tabung Durham.

◆ Salt Medium

| | |
|---------------|-----|
| Yeast extract | 5 g |
|---------------|-----|

NaCl 100g/150g/200g

Semua bahan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer. Dicampur secara merata dengan “magnetic stirer”. Disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm.

❖ Medium Glukosa 50 %

| | |
|----------------|--------|
| Glukosa | 500 g |
| Yeast extract | 24,6 g |
| Agar | 24,6 g |
| Akuades steril | 500 ml |

Semua bahan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer. Dicampur secara merata dengan “magnetic stirer”. Disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm.

❖ Medium glukosa 60%

| | |
|----------------|--------|
| Glukosa | 600 g |
| Yeast extract | 23,4 g |
| Agar | 23,4 g |
| Akuades Steril | 400 ml |

Semua bahan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer. Dicampur secara merata dengan “magnetic stirer”. Disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm.

❖ Urea agar

| | |
|--------------------------|-----|
| Pepton | 1 g |
| Glukosa | 1 g |
| NaCl | 5 g |
| KH_2PO_4 | 2 g |

| | |
|------------------|---------|
| Fenol merah | 1 tetes |
| Agar | 20 g |
| Larutan urea 20% | 100 ml |
| Akuades steril | 1 L |

Semua bahan, kecuali Larutan urea 20 %, dimasukkan ke dalam Erlenmeyer. Dicampur secara merata dengan “magnetic stirrer”. Disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121⁰C dan tekanan 2 atm. Diatur pH pada 6,8. Ditambahkan 100 ml Larutan urea 20 % yang sudah disterilisasi dengan autoklaf.

❖ Glukosa Chalk Agar

| | |
|-------------------|------|
| Yeast extract | 5 g |
| Glukosa | 50 g |
| CaCO ₃ | 5 g |
| Agar | 15 g |
| Akuades Steril | 1 L |

Semua bahan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer. Dicampur secara merata dengan “magnetic stirrer”. Disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121⁰C dan tekanan 2 atm.

❖ Gorodkova Agar

| | |
|----------------|------|
| Glukosa | 1 g |
| Bacto pepton | 10 g |
| Agar | 20 g |
| NaCl | 5 g |
| Akuades Steril | 1 L |

Semua bahan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer. Dicampur secara merata dengan “magnetic stirer”. Disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm.

❖ Potato Dextrose Agar

| | |
|----------------|------|
| Glukosa | 20 g |
| Agar | 5 g |
| Potato | 4 g |
| Asam tartar | 14 g |
| Akuades Steril | 1 L |

Semua bahan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer. Dicampur secara merata dengan “magnetic stirer”. Disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm.

❖ YMA

| | |
|----------------|------|
| Glukosa | 10 g |
| Pepton | 5g |
| Malt Extract | 3 g |
| Yeast Extract | 3 g |
| Agar | 20 g |
| Akuades Steril | 1 L |

Semua bahan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer. Dicampur secara merata dengan “magnetic stirer”. Disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm.

◆ YMB

| | |
|----------------|------|
| Glukosa | 10 g |
| Pepton | 5g |
| Malt Extract | 3 g |
| Yeast Extract | 3 g |
| Akuades steril | 1 L |

Semua bahan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer. Dicampur secara merata dengan “magnetic stirrer”. Disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121⁰C dan tekanan 2 atm.



Lampiran 02. Pembuatan larutan fruktosa standar

Bahan

Fruktosa 100 mg

Akuades 100 ml

Dibuat larutan fruktosa dengan konsentrasi 1 mg/ml dengan cara melarutkan 100 mg fruktosa ke dalam 100 ml akuades dengan cara dipanaskan hingga semua fruktosaterlarutkan. Dilakukan pengenceran untuk mendapatkan konsentrasi 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; dan 1,0 mg/ml dengan cara:

Table 03 . Pembuatan larutan fruktosa standar dengan konsentrasi yang berbeda

| Tabung | Larutan Fruktosa (ml) | Akuades (ml) | Fruktosa (mg/ml) |
|--------|--------------------------|--------------|------------------|
| 1 | 0,0 | 1,0 | 0,0 |
| 2 | 0,2 | 0,8 | 0,2 |
| 3 | 0,4 | 0,6 | 0,4 |
| 4 | 0,6 | 0,4 | 0,6 |
| 5 | 0,8 | 0,2 | 0,8 |
| 6 | 1,0 | 0,0 | 1,0 |

Lampiran 03. Pembuatan larutan "Bovine Serum Albumin" (BSA) standar

Bahan

BSA (Bovine Serum Albumin) 0,03 g
 Buffer sitrat pH 6,0; 0,01 M 100 ml

Akuades

Dibuat larutan BSA dengan konsentrasi 0,3 mg/ml dengan cara melarutkan 0,03 g BSA ke dalam larutan buffer sitrat 0,01 M; pH 6,0 yang sebelumnya telah didinginkan pada suhu 10° C selama 24 jam hingga mencapai volume 100 ml. Dilakukan pengenceran untuk mendapatkan konsentrasi 0,06; 0,12; 0,18; 0,24; 0,30 mg/ml dengan cara:

Tabel 04. Pembuatan larutan BSA standar dengan konsentrasi yang berbeda

| Tabung | Larutan BSA (ml) | Akuades (ml) | Protein (mg/ml) |
|--------|------------------|--------------|-----------------|
| 1 | 0,0 | 1,0 | 0,00 |
| 2 | 0,2 | 0,8 | 0,06 |
| 3 | 0,4 | 0,6 | 0,12 |
| 4 | 0,6 | 0,4 | 0,18 |
| 5 | 0,8 | 0,2 | 0,24 |
| 6 | 1,0 | 0,0 | 0,30 |

Lampiran 04. Pembuatan kurva larutan fruktosa standar

Table 05. Analisis regresi dan korelasi larutan fruktosa standar

| X | Y | X ² | XY | Y ² |
|---------------------------|---------------------------------|------------------|--------------------|---------------------|
| 0.2 | 0.0809 | 0.04 | 0.0162 | 0.0065 |
| 0.4 | 0.2147 | 0.16 | 0.0859 | 0.0461 |
| 0.6 | 0.2924 | 0.36 | 0.1754 | 0.0855 |
| 0.8 | 0.3187 | 0.64 | 0.2550 | 0.1016 |
| 1.0 | 0.5686 | 1.00 | 0.5686 | 0.3233 |
| $\Sigma X=3.0$ $X=0.6$ | $\Sigma Y=1.4753$ $Y=0.2951$ | $\Sigma X^2=2.2$ | $\Sigma XY=1.1011$ | $\Sigma Y^2=0.5630$ |

Persamaan kurva

$$Y = a + bX$$

$$b = \frac{n \cdot \Sigma XY - \Sigma X \cdot \Sigma Y}{n \cdot \Sigma X^2 - (\Sigma X)^2}$$

$$5 \times (1.1011) - (3.0) \times (1.4753) = 0.5398$$

$$(5 \times 2.2) - 9$$

$$Y = a + bX$$

$$a = Y - bX$$

$$a = 0.2951 - (0.5398 \times 0.6)$$

$$= -0.0286$$

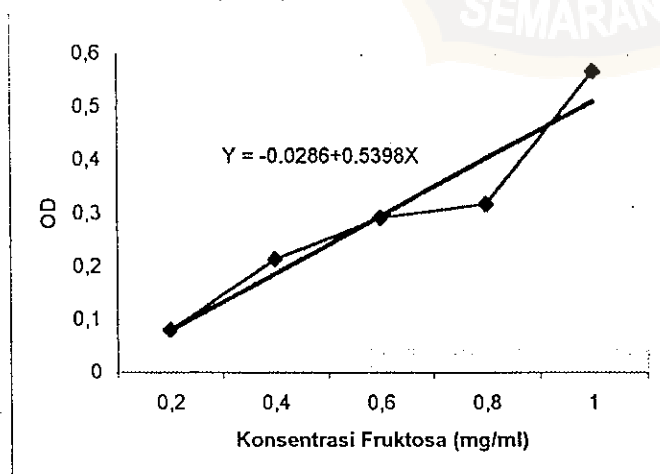
$$Y = -0.0286 + 0.5398 X$$

$$\delta X^2 = n \cdot \Sigma X^2 - (\Sigma X)^2 = (5 \times 2.2) - 9 = 2$$

$$\delta Y^2 = n \cdot \Sigma Y^2 - (\Sigma Y)^2 = (5 \times 0.5630) - 2.1765 = 0.6385$$

$$\delta XY = n \cdot \Sigma XY - \Sigma X \cdot \Sigma Y = (5 \times 1.1011) - (3.0 \times 1.4753) = 1.0796$$

$$r = \frac{\delta XY}{(\delta X^2)^{1/2} \cdot (\delta Y^2)^{1/2}} = 0.955$$



Gambar 06. Kurva larutan fruktosa standar

Lampiran 05. Pembuatan kurva larutan "Bovine Serum Albumin" (BSA) standar

Table 06. Analisis regresi dan korelasi larutan "Bovine Serum Albumin" (BSA) standar

| X | Y | X ² | XY | Y ² |
|------|--------|----------------|--------|----------------|
| 0.06 | 0.0223 | 0.0036 | 0.0013 | 0.0005 |
| 0.12 | 0.0555 | 0.0144 | 0.0067 | 0.0031 |
| 0.18 | 0.0655 | 0.0324 | 0.0118 | 0.0043 |
| 0.24 | 0.0970 | 0.0579 | 0.0233 | 0.0094 |
| 0.30 | 0.1482 | 0.0900 | 0.0445 | 0.0220 |

$\Sigma X = 0.9$ $\Sigma Y = 0.3885$ $\Sigma X^2 = 0.1983$ $\Sigma XY = 0.0876$ $\Sigma Y^2 = 0.0393$
 $X = 0.18$ $Y = 0.0777$

Persamaan kurva

$$Y = a + bX$$

$$b = \frac{n \cdot \Sigma XY - \Sigma X \cdot \Sigma Y}{n \cdot \Sigma X^2 - (\Sigma X)^2}$$

$$\frac{5 \times (0.0876) - (0.9) \times (0.3885)}{(5 \times 0.1983) - 0.81} = 0.4867$$

$$Y = a + bX$$

$$a = Y - bX$$

$$a = 0.0777 - (0.4867 \times 0.18) = -0.0099$$

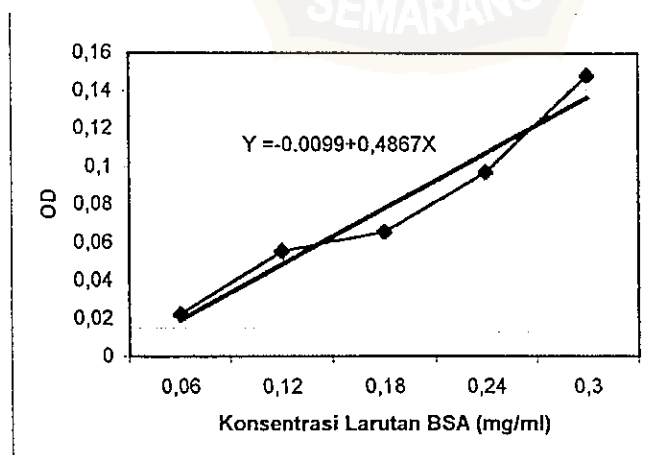
$$Y = -0.00099 + 0.4867X$$

$$\delta X^2 = n \cdot \Sigma X^2 - (\Sigma X)^2 = (5 \times 0.1983) - 0.81 = 0.1815$$

$$\delta Y^2 = n \cdot \Sigma Y^2 - (\Sigma Y)^2 = (5 \times 0.0393) - 0.1509 = 0.0456$$

$$\delta XY = n \cdot \Sigma XY - \Sigma X \cdot \Sigma Y = (5 \times 0.0876) - (0.9 \times 0.3885) = 0.0884$$

$$r = \frac{\delta XY}{(\delta X^2)^{1/2} \cdot (\delta Y^2)^{1/2}} = 0.972$$



Gambar. 07. Kurva larutan "Bovine Serum Albumin" (BSA) standar

Lampiran 06. Aktivitas Inulinase, Kadar Protein , Aktivitas Spesifik Inulinase, dan Pertumbuhan Sel dari DUCC Y4-W.

Tabel 07. Aktivitas Inulinase dari DUCC Y4-W setiap 6 jam sekali.

| Waktu Inkubasi (jam) | OD | | Kadar Fruktosa | | Xs-Xb (mg/ ml) | Aktivitas Inulinase ($\times 10^{-3}$ Unit/ml) |
|----------------------|-------------|-------------|----------------|-------------|----------------|---|
| | Sampel (Ys) | Blanko (Yb) | Sampel (Xs) | Blanko (Xb) | | |
| 0 | 1,6498 | 1,4686 | 3,1093 | 2,7736 | 0,3357 | 0,7460 |
| 6 | 1,8860 | 1,6778 | 3,5469 | 3,1612 | 0,3857 | 0,8570 |
| 12 | 1,7100 | 1,5640 | 3,2208 | 2,9504 | 0,2705 | 0,6010 |
| 18 | 1,9172 | 1,3354 | 3,6047 | 2,5269 | 1,0778 | 2,3950 |
| 24 | 1,7340 | 1,6498 | 3,2653 | 3,1093 | 0,1560 | 0,3470 |
| 30 | 1,7720 | 1,5918 | 3,3357 | 3,0019 | 0,3338 | 0,7420 |
| 36 | 1,5494 | 1,3980 | 2,9233 | 2,6428 | 0,2805 | 0,6230 |
| 42 | 1,5686 | 1,4908 | 2,9589 | 2,8147 | 0,1441 | 0,3200 |
| 48 | 1,4686 | 1,3990 | 2,7736 | 2,6447 | 0,1289 | 0,2870 |

$$Y = -0.0286 + 0.5398 X$$

Aktivitas Enzim = Unit/ml

$$= P (Xs-Xb) / (BM Fruktosa \times 10)$$

Tabel 08. Kadar Protein dari DUCC Y4-W setiap 6 jam sekali.

| Waktu Inkubasi (jam) | OD | Kadar Protein (mg/ml) |
|----------------------|--------|-----------------------|
| 0 | 1,1249 | 2,3317 |
| 6 | 0,6938 | 1,4458 |
| 12 | 0,7047 | 1,4682 |
| 18 | 0,9122 | 1,8946 |
| 24 | 0,4517 | 0,9485 |
| 30 | 0,3550 | 0,7497 |
| 36 | 0,3864 | 0,8142 |
| 42 | 0,2498 | 0,5336 |
| 48 | 0,2270 | 0,4867 |

Y = OD, X = kadar protein

$$Y = -0.00099 + 0.4867 X$$

Tabel 09. Aktivitas Spesifik Inulinase dari DUCC Y4-W setiap 6 jam sekali.

| Waktu Inkubasi (jam) | Aktivitas Spesifik ($\times 10^{-3}$ U/mg protein) |
|----------------------|---|
| 0 | 0,3199 |
| 6 | 0,5928 |
| 12 | 0,4093 |
| 18 | 1,2641 |
| 24 | 0,3654 |
| 30 | 0,9895 |
| 36 | 0,7655 |
| 42 | 0,6002 |
| 48 | 0,5887 |

Aktivitas spesifik = Aktivitas enzim / mg protein

Tabel 10. Pertumbuhan Sel DUCC Y4-W.

| Waktu Inkubasi (jam) | OD |
|----------------------|--------|
| 0 | 0,1079 |
| 6 | 0,2365 |
| 12 | 0,3565 |
| 18 | 0,5228 |
| 24 | 0,6989 |
| 30 | 0,6575 |
| 36 | 0,3979 |
| 42 | 0,2839 |
| 48 | 0,1307 |